

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **2001-112496**(43)Date of publication of application : **24.04.2001**

(51)Int.Cl.

C12P 19/14(21)Application number : **11-298058**(71)Applicant : **NIPPON PAPER INDUSTRIES CO LTD**(22)Date of filing : **20.10.1999**(72)Inventor : **ARAI MOTOO
TABATA MASAHIKO****(54) PRODUCTION OF CELLOOLIGOSACCHARIDE****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an inexpensive and efficient technique for producing cellooligosaccharide that is useful in the fields of food industry and the lie.

SOLUTION: Alfa-glucan phosphorylase, cellobiose phosphorylase and cellodextrin phosphorylase are allowed to act on soluble starch as a raw material to produce the objective cellooligosaccharide in such high efficiency that the conventional processes could never reach whereby cellooligosaccharide can be provided expensively and efficiently.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.06.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 02.12.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2004-26600

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 28.12.2004

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-112496

(P2001-112496A)

(43) 公開日 平成13年4月24日 (2001.4.24)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

テマコード (参考)

C 1 2 P 19/14

C 1 2 P 19/14

Z 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平11-298058

(22) 出願日

平成11年10月20日 (1999.10.20)

(71) 出願人 000183484

日本製紙株式会社

東京都北区王子1丁目4番1号

(72) 発明者 荒井 基夫

大阪府堺市鴨谷台3-2-20-204

(72) 発明者 把田 雅彦

山口県岩国市飯田町2-8-1 日本製紙
株式会社化成品開発研究所内

(74) 代理人 100063484

弁理士 箕浦 清

Fターム (参考) 4B064 AF04 CA21 CC03 CC24 CD19
DA10

(54) 【発明の名称】 セロオリゴ糖の製造法

(57) 【要約】

【課題】 安価且つ効率的なセロオリゴ糖製造技術を提供し食品分野をはじめとした応用を図る。

【解決手段】 可溶性澱粉を原料に α -グルカンホスホリラーゼ、セロビオースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼを作用させることにより従来にはない高効率でセロオリゴ糖を生産する。

【効果】 安価且つ効率的なセロオリゴ糖が提供できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 可溶性澱粉に α -グルカンホスホリラーゼを作用させて、加リン酸分解反応によりグルコース1リン酸を生成し、得られたグルコース1リン酸をグルコース供与体にしてグルコース受容体としてのグルコースの存在下にセロビオースホスホリラーゼ及びセロデキストリンホスホリラーゼを反応させることを特徴とするセロオリゴ糖の製造法。

【請求項2】 使用する可溶性澱粉が予め α -アミラーゼを作用させて加リン酸分解され易い状態にしたものであることを特徴とする請求項1記載のセロオリゴ糖の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はセロオリゴ糖の製造法に関し、詳しくは可溶性澱粉を原料に α -グルカンホスホリラーゼ、セロビオースホスホリラーゼ及びセロデキストリンホスホリラーゼを作用させる事によるセロオリゴ糖の製造法に関するものである。

【0002】セロオリゴ糖はブドウ糖が2個以上 β -1,4結合したオリゴ糖であり、低甘味なため食品分野をはじめとして利用されるオリゴ糖である。

【0003】使用する酵素 α -グルカンホスホリラーゼ(EC2.4.1.1)は澱粉を加リン酸分解する酵素であり、澱粉とリン酸を原料としてグルコース1リン酸と α -グルカンが得られる。使用する酵素セロビオースホスホリラーゼ(EC2.4.1.20)はセロビオースを加リン酸分解する酵素であり、セロビオースとリン酸を原料としてグルコース1リン酸とグルコースが得られる。セロデキストリンホスホリラーゼ(EC2.4.1.49)はセロデキストリンを加リン酸分解する酵素であり、セロデキストリンとリン酸を原料としてグルコース1リン酸とセロデキストリンが得られる。これらの酵素は上記反応の逆反応も進行させることが出来る。

【0004】

【従来の技術】食品の持つ本来の機能としては、「おいしさ」と「栄養」であるが、近年ではこれらに加え第三次機能である「生体調節機能」が重要視されてきている。以前より増して健康に関心が持たれるようになっている昨今、疾病予防や健康維持・増進に寄与する生体調節機能を有する食品が数多く開発されている。

【0005】中でもオリゴ糖は数多くの食品に用いられており、市場規模も年々増大の一途を辿っている。オリゴ糖の有する機能についてはその種類により多少異なるが、ビフィズス菌増殖因子、抗うつ性、肥満防止、コレステロール抑制などが挙げられる。

【0006】セロオリゴ糖はブドウ糖が2個以上 β -1,4結合したオリゴ糖であり、低甘味、難消化性でビフィズス菌増殖因子やボディー効果も有している。よって最近の低甘味・低カロリー志向にはうってつけであ

り、低甘味糖質やボディー補強剤等の食品分野をはじめとする用途が考えられる。セロオリゴ糖の中でもセロビオースは天然には松葉やトウモロコシの茎に存在することが明らかにされている。その他のセロオリゴ糖に関しては、日常食に供する植物などに広く存在するセルロースの分解過程で生成するものであり、いずれも天然物であると共に食としての経歴があるために安全性に関しては何ら問題がないものである。

【0007】従来から知られているセロオリゴ糖の製造法としては、化学的方法と酵素的方法とに分けられる。化学的方法は、発煙塩酸・濃硫酸によりセルロースを酸加水分解後、カーボンカラム等によりセロオリゴ糖を分画分取する方法(Miller,G.L,Methods in Carbohydrate Chemistry III (Academic Press),134(1963))等が知られている。

【0008】一方、酵素的な方法ではアモルファスなセルロースにセルビブリオ(Cellvibrio)属に属する微生物が生産するセルラーゼを作用させ、限外濾過反応器を組み合わせる事により生成物阻害を解除してセロオリゴ糖を生成させることが知られている(特開平1-256394号公報)。又、予めセルラーゼをpH3.5~5.0に平衡化した弱酸性陽イオン交換樹脂に接触させ、セルラーゼ中の β -グルコシダーゼを選択的に除去したセルラーゼをセルロースに作用させて、セロオリゴ糖を製造する方法もある(特開平5-115293号公報)。又、アモルファスセルロースを原料にセルラーゼを作用させてセロオリゴ糖を生成させる反応において、リグニン存在下のもとに反応を進行させると共に限外濾過反応装置にてセロビオースを随時採取する方法が知られている(特公平6-95943号公報)。さらに、湿潤状態の未晒しサルファイトパルプを原料にセルラーゼを作用させる系で限外濾過装置を組み合わせ、セロビオースを含むセロオリゴ糖を作る方法が知られている(特公平8-2312号公報)。

【0009】しかしながら、これらの方法はいずれも工業的には多くの問題点を抱えている。すなわち、上記従来技術のうち化学的方法では、反応操作が濃硫酸・濃塩酸を取り扱うと共に、セロオリゴ糖分画に大容量のカーボンカラムを用い溶出に大量のエタノールを使用するなど操作が非常に煩雑である。なお且つセロオリゴ糖収率も十分でないために、食品分野で使用するには製造コストが非常に高く、工業的に大量生産されるに至っておらず、セルラーゼ研究の試薬用に極少量生産されているにすぎない。

【0010】一方、酵素法は化学的方法と比べると非常に穏和な条件下で反応を行わせることが可能であるが、元来セルロースは非常に強固な結晶領域を有しているために、酵素が作用し難いという問題がある。従って反応収率を向上させるために、セルロースの物理的・化学的処理といった前処理が不可欠であり、工業的製法に適した経済的な前処理方法は未だ開発されていない。

【0011】セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*) の生産する酵素はセロビオースを特異的に生成するという特徴を有しているが、基質であるセルロースがアモルファスでないと作用せず、酵素の力価や生産性も十分でない。イオン交換樹脂を用いてβ-グルコシダーゼを吸着除去させる方法においては、β-グルコシダーゼのみが選択的に吸着除去されるとは限らず、吸着除去工程で他の構成セルラーゼも活性が低下してしまう。更にスケールアップに至っては、操作も複雑になってくるため、必ずしも有利な方法といえない。リグニンにβ-グルコシダーゼを吸着させる方法においては、基質としてアモルファスなセルロースを使用する必要があると共に、リグニンがセルロースに吸着し、分解を阻害してしまうという問題もある。又、湿潤状態の未晒しサルファイトバルブを原料にセルラーゼを作用させる方法では、基質がかなり膨潤した状態であるため基質濃度を高めることが出来ず、その結果、生成物の濃度が非常に低く効率が悪い。このように、酵素法においても様々な問題点があり実用化は行われていないのが現状である。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術の背景を踏まえ、本発明の目的は安価で効率的な工業的生産が可能なセロオリゴ糖製造法を提供し、食品分野をはじめとして各種生理活性が期待されているセロオリゴ糖の普及を図ることである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、工業的にも広く用いられている安価な可溶性澱粉を原料に、α-グルカンホスホリラーゼ、セロビオースホスホリラーゼ、及びセロデキストリンホスホリラーゼを作用させることにより、セロオリゴ糖を極めて効率よく得られる事を見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】すなわち、本発明の上記目的は可溶性澱粉にα-グルカンホスホリラーゼを作用させグルコース1リン酸を合成し、得られたグルコース1リン酸をグルコース供与体、グルコースをグルコース受容体として、セロビオースホスホリラーゼ及びセロデキストリンホスホリラーゼを作用させて、セロオリゴ糖を生成蓄積させることにより達成することが出来る。可溶性澱粉を原料としたセロオリゴ糖の製造法はこれまで全く知られていなかった。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明は工業的にも広く用いられている安価で入手も容易で安全性も高い可溶性澱粉を原料に、α-グルカンホスホリラーゼ、セロビオースホスホリラーゼ、及びセロデキストリンホスホリラーゼの3種類の酵素を作用させることにより、セロオリゴ糖を極めて効率よく得る事を特徴としている。以下に本発明をさらに詳細に説明する。

【0016】本発明で使用する可溶性澱粉は、通常工業的に実施されているように澱粉スラリーに希薄な塩酸や硫酸等の無機酸を作用させることにより容易に得ることが出来る。

【0017】本発明で用いる酵素としては、α-グルカンホスホリラーゼについては、例えばジャガイモから得ることが出来る。その他トウモロコシや大腸菌をはじめとした微生物から幅広く得ることが出来る。セロビオースホスホリラーゼについては、クロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*)、ルミノコッカス・フラベファシエンシス (*Ruminococcus flavefaciens*)、セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*) 等が産生することが知られている。セロデキストリンホスホリラーゼについては、クロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*)、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属等が産生することが知られている。これらの微生物培養を通常の培養方法により行い培地中に酵素を生成蓄積させることが出来る。すなわち、これらの微生物を適当な炭素源、窒素源、無機塩、ビタミン類、微量金属を含む培地中において、温度、pH等を制御しつつ培養を行えばよい。炭素源としてはセロビオースを唯一の炭素源とするほか、グルコース、シュークロース、澱粉等を併用しても良い。窒素源としてはカゼイン、ペプトン、酵母エキス、大豆蛋白質加水分解物等の有機物、あるいはリン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機物何れであっても良い。無機塩は硫酸マグネシウムやリン酸1カリウム等である。培養は各微生物の最適条件下で12時間～3日程度通気攪拌培養すればよい。

【0018】菌体内に蓄積される酵素の場合、菌体そのものを酵素源として使用することもできるが、必要により菌体破碎を行い公知の方法で精製しても良い。酵素の使用形態としては必ずしも精製して使用する必要はなく、培養上清あるいは精製段階の標品など何れを用いても良い。又、酵素は遊離の状態で使用しても、可溶性あるいは不溶性の担体に固定化した状態で使用してもどちらでも良い。

【0019】グルコース1リン酸の調製は、可溶性澱粉にα-グルカンホスホリラーゼを作用させて行う。ここでグルコース1リン酸の収率を高めるには、予め可溶性澱粉をα-アミラーゼで部分分解して非還元末端数を増やし、加リン酸分解されやすい状態にしておくのが非常に重要である。通常、α-アミラーゼを澱粉に対し0.1～2%添加し1～12時間程度分解すれば十分である。

【0020】反応条件は5～20重量%の澱粉溶液とα-グルカンホスホリラーゼとをリン酸緩衝液下で反応させる。pHと温度は本酵素の至適範囲内でコントロールすれば良い。得られたグルコース1リン酸はこの状態のまま使用しても差し支えないが、精製する場合は無機リン酸を沈殿除去後陰イオン交換樹脂に吸着後、アルカリ

で溶出し、エタノールで析出させる。

【0021】このようにして得られたグルコース1リン酸をグルコース供与体に、グルコースをグルコース受容体として、セロピオースホスホリラーゼとセロデキストリンホスホリラーゼとを反応させてセロオリゴ糖を得る。

【0022】基質はグルコース0.05~0.5M、グルコース1リン酸0.05~0.5M、セロピオースホスホリラーゼ0.2~5U/ml、セロデキストリンホスホリラーゼ0.1~3U/mlの系で反応させる。ユニットの定義は下に示すとおりである。

【0023】<セロピオースホスホリラーゼの活性測定>本活性はグルコースにより阻害されるためグルコースの代わりにキシロースを受容体として活性測定を実施した。試料50μl、250mM Tris-Malate-NaOH緩衝液50μl、50mMジチオトレイトール50μl、200mMグルコース1リン酸を加えて200mlとし、37℃で10分間ブレインキュベートした後、2mMキシロースを50μl加えて反応を開始した。15分の反応後5%トリクロロ酢酸を750μl添加して反応停止させた。キシロースの代わりに水を用いて同様な操作を行いブランクとした。これらの反応液を遠心分離して得た上清をFiske-Sabbarow法によりリン酸量を求めた。

1U:15分間に1μmolのリン酸を遊離させる酵素量

【0024】<セロデキストリンホスホリラーゼの活性測定>本活性はセロピオースを受容体として活性測定を実施した。試料50μl、5mMEDTA50μl、50mMジチオトレイトール50μl、200mMグルコース1リン酸を加えて200mlとし、37℃で10分間ブレインキュベートした後、100mMセロピオースを50μl加えて反応を開始した。15分間の反応後5%トリクロロ酢酸を750μl添加して反応停止させた。キシロースの代わりに水を用いて同様な操作を行いブランクとした。これらの反応液を遠心分離して得た上清をFiske-Sabbarow法によりリン酸量を求めた。

1U:15分間に1μmolのリン酸を遊離させる酵素量

【0025】<Fiske-Sabbarow法によるリン酸定量>試料溶液に5N硫酸、還元試薬、3.3%モリブデン酸アンモニウムの順に1mlずつ添加し、更に純水7mlを加えて攪拌し室温で20分間放置後、720nmの吸光度を測定した。リン酸量はリン酸1カリウムを用いた標準曲線から算出した。

還元試薬: amydol 4.0g

NaHSO₃ 8.0g/100ml

反応時間は反応条件により異なるが、6~20時間程度反応させれば十分である。反応終了後、セロオリゴ糖を含む反応液を得ることが出来る。この反応液中には、少量のグルコースが含有されているが、必要に応じて公知の精製手段により、グルコースを除去しセロオリゴ糖のみを得ることもできる。本発明方法によれば、煩雑な操

作や基質の前処理などを全くすること無しにセロオリゴ糖を高収率で得ることが出来、副生成物も少ないので精製操作が非常に簡単であるという特徴を有している。

【0026】

【実施例】以下、実施例に従って本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれによって限定されるものではない。下記の実施例におけるセロオリゴ糖の定量は高速液体クロマトグラフィーを用い、ピーク面積から求めた。すなわち、ポンプは日本分光社製880-PU、検出器は昭和電工社製SE-61、カラムはRainin社製NH₂ (4.6×250mm)、溶媒はアセトニトリル:水=65:35、流速は1ml/minで行った。

【0027】(実施例1)

グルコース1リン酸の調製

グルコース1リン酸はポテトのα-グルカンホスホリラーゼを用いて可溶性澱粉から調製した。α-グルカンホスホリラーゼは、0.01MKCN 150ml中にすりおろしたじゃがいも300gをミキサーで攪拌し、ガーゼで絞った後澱粉を沈殿させその上清を酵素溶液とした。15%可溶性澱粉溶液にαアミラーゼ(天野製薬製:アミラーゼA「アミノ」)を0.2%(対基質)添加し、60℃、pH6、2時間反応させて部分消化した。上記酵素溶液と15%澱粉溶液とをリン酸緩衝液(10mM、pH6.7)中で室温で16時間反応させた。反応後加熱により酵素反応を止め、リン酸マグネシウムを添加し、pHを8.4に調整し無機リン酸を沈殿させた。上清を陽イオン交換樹脂Dowex50(5×40cm)に通し、過剰のマグネシウムイオンやアンモニウムイオンを除去した後に、陰イオン吸着樹脂にDowex1(2.5×45cm)に吸着させた。蒸留水で洗浄後5%KOHで溶出し、98%エタノール2倍容を加えグルコース1リン酸の結晶を析出させた。結晶はエタノール、エーテルで洗浄し吸引乾燥した。

【0028】セロピオースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼの調製

セロピオースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼはClostridium thermocellumより取得した両酵素の遺伝子を、大腸菌で発現させたものを用いた。セロピオースホスホリラーゼをコードする遺伝子が導入された発現ベクターにはpBH4を、セロデキストリンホスホリラーゼをコードする遺伝子が導入された発現ベクターにはpTEH1を用い、これら大腸菌で発現させる際の宿主にはDH5αを用いた。

【0029】①コンピテントセルの調製

Hanahanの方法(Hanahan,D.:Techniques for Transformation of E.coli. In:DNA Cloning,vol1,Glover,D.M.(ed),pp109-136,IRL Press,1985.)に準じて調製した。

②形質転換

Cohenらの方法(Cohen,S.N.,Chang,A.C.and Hsu,I.:Proc.Natl.Acad.Sci.USA,69,2110(1973))に準じて行った。

形質転換後アンピシリン含有のLB寒天培地に塗布し、pBH4を導入したものは30℃で24時間、pTEH1を導入したものは37℃で16時間培養しコロニーを形成させた。

③セロビオースホスホリラーゼの調製

pBH4を導入した大腸菌のコロニーから2mlのアンピシリン含有2×TY培地（トリプトン：16g、酵母エキス：10g、NaCl：5g/1L純水）に接種し、30℃で24時間振とう培養培養した。培養液を集菌洗浄後、0.1%2-メルカプトエタノールを含む50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.0）に懸濁した。超音波処理により菌体を破碎後、遠心分離により菌体残渣を除去し粗酵素液とした。

④セロデキストリンホスホリラーゼの調製

pTEH1を導入した大腸菌のコロニーから2mlのアンピシリン含有2×TY培地に接種し、37℃で16時間振とう培養培養した。培養液を集菌洗浄後、0.1%2-メルカプトエタノールを含む50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.2）に懸濁した。超音波処理により菌体を破碎後、遠心分離により菌体残渣を除去し粗酵素液とした。

【0030】以上のように調整したグルコース1リン酸、セロビオースホスホリラーゼ及びセロデキストリンホスホリラーゼを用いてセロオリゴ糖の合成を行った。グルコース100mM、グルコース1リン酸80mM、DTT10mM、EDTA1mM、トリス-塩酸緩衝液25mM（pH7.0）、セロビオースホスホリラーゼ1U/ml、セロデキストリンホスホリラーゼ1U/mlを含む反応液を50℃で12時間反応させた。反応生成物をHPLCにて分析したところ、セロオリゴ糖の組成は、セロビオース：30%、セロトリオ

ース：29%、セロテトラオース：19%、セロペンタオース：15%、セロヘキサオース：7%であり、可溶性澱粉からのセロオリゴ糖収率は60%であった。

【0031】（実施例2）2個のカラム（1cm×5cm）に多孔質セラミックを充填し、トリス-塩酸緩衝液で洗浄し、各々カラム1、カラム2とした。カラム1に実施例1で調製したセロビオースホスホリラーゼ溶液を通液し、トリス-塩酸緩衝液（pH7.0）で洗浄し固定化セロビオースホスホリラーゼとした。同様にカラム2に実施例1で調製したセロデキストリンホスホリラーゼ溶液を通液し、トリス-塩酸緩衝液（pH7.2）で洗浄し固定化セロデキストリンホスホリラーゼとした。このカラムを直列に接続し、カラム1は50℃、カラム2は50℃に保持し、2連型固定化酵素カラムリアクターを構築した。グルコース100mM、グルコース1リン酸80mM、DTT10mM、EDTA1mM、トリス-塩酸緩衝液25mM（pH7.0）を含む溶液を5ml/時間の流速でカラム1→カラム2→カラム1の順で循環させ8時間反応させた。反応生成物をHPLCにて分析したところ、セロオリゴ糖の組成は、セロビオース：27%、セロトリオース：31%、セロテトラオース：20%、セロペンタオース：17%、セロヘキサオース：5%であり、可溶性澱粉からのセロオリゴ糖収率は72%であった。

【0032】

【発明の効果】本発明によりセロオリゴ糖を低コストで効率良く生産することが可能となり、従来大量生産技術が確立されていないために用いることが出来なかった食品分野をはじめとして、新素材としての用途が期待され、その工業的意義は極めて大きいと考えられる。